

**ВЛИЯНИЕ АРГИНИНА НА АКТИВНОСТЬ
И КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЮ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ
ПРОТЕИНАЗ ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНОВ
ПРИ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ НА ФОНЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ**

© М.А. Фомина¹, А.А. Терентьев²

ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, Россия (1)

ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия (2)

Цель. Оценка влияния аргинина на активность и внутриклеточное распределение катепсинов В, L, Н в ткани печени, почки и легкого при экспериментальной гипергомоцистеинемии и развивающегося на ее фоне окислительного повреждения белков. **Материалы и методы.** Гипергомоцистеинемии у крыс-самцов линии *Wistar* формировали пероральным введением суспензии метионина в дозе 1,5 г/кг ежедневно 2 раза в сутки в течение 21 суток, для изучения действия аргинина субстанцию в дозе 500 мг/кг применяли перорально с 12 по 21 сутки введения метионина. В гомогенатах тканей измерения проводились в цитоплазматической и лизосомальной фракциях. Оценка состояния окислительной модификации белков проводилась анализом спектра поглощения карбонильных производных, активность катепсинов В, L, Н – спектрофлуориметрическим методом, активность кислой фосфатазы – унифицированным методом «по конечной точке». **Результаты.** В цитоплазматической (неседиментируемой) фракции печени и почки на фоне нарастания продуктов окислительной модификации белков при экспериментальной гипергомоцистеинемии обнаружено снижение активности катепсина L (в обеих тканях), катепсина В (в почке), катепсина Н (в печени). Введение аргинина при экспериментальной гипергомоцистеинемии полностью устраняло проявления окислительного повреждения белков, частично корректируя активность ферментов: наблюдалось нарастание активности в неседиментируемой (цитоплазматической) фракции за счет внутриклеточного перераспределения ферментов. Обнаружены обратные корреляционные связи между содержанием продуктов окислительного карбонилирования белков и активностью катепсинов в неседиментруемой фракции, а также долей их неседиментируемой активности. **Выводы.** 1. Аргинин в дозе 500 мг/кг при 10-дневном введении полностью корректирует развивающееся на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии повышение продуктов окислительного карбонилирования белков. 2. Под действием аргинина происходит нарастание сниженной при изолированной гипергомоцистеинемии активности катепсинов В, L, Н в цитоплазматической фракции печени и почки за счет внутриклеточного перераспределения ферментов. 3. Изменения компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ под действием аргинина происходят через вызываемое им неселективное повышение проницаемости лизосомальной мембраны. 4. Обнаружены обратные корреляционные связи содержания продуктов окислительной модификации белков с активностью катепсинов в цитоплазматической (неседиментируемой) фракции и долей их неседиментируемой активности, позволяющие предполагать наличие вклада изменения компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ в разви-



вающуюся под действием аргинина компенсацию окислительного стресса на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, аргинин, катепсины B, L, H, окислительная модификация белков.

THE EFFECT OF ARGININE ON THE ACTIVITY AND COMPARTMENTALIZATION OF LYSOSOMAL CYSTEINE PROTEINASES OF PARENCHYMATOUS ORGANS IN OXIDATIVE STRESS ON THE BACKGROUND OF EXPERIMENTAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA

M.A. Fomina¹, A.A. Terent'ev²

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia (1)

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia (2)

Aim. Evaluation of the effect of arginine on the activity and intracellular distribution of cathepsins B, L, H in liver, kidney and lung tissue in experimental hyperhomocysteinemia and developing on its background oxidative damage of proteins. **Materials and Methods.** Hyperhomocysteinemia in male rats of the *Wistar* line was formed by daily oral administration of a suspension of methionine at a dose of 1.5 g/kg 2 times a day for 21 days, to study the action of arginine the substance was used orally from 12 to 21 days of methionine administration at a dose of 500 mg/kg. In tissue homogenates measurements were carried out in cytoplasmic and lysosomal fractions. The state of oxidative modification of proteins was evaluated by analysis of the absorption spectrum of carbonyl derivatives, the activity of cathepsins B, L, H was determined by spectrofluorometric method, the activity of acid phosphatase – by the unified method «at the end point». **Results.** In the cytoplasmic (nonsedimentary) fraction of the liver and kidney reduced activity of cathepsin L (in both tissues), cathepsin B (in the kidney), cathepsin H (in the liver) was found on the background of the increase in the products of proteins oxidative modification in experimental hyperhomocysteinemia. The introduction of arginine in experimental hyperhomocysteinemia completely eliminated the manifestations of oxidative damage of proteins, partially correcting the activity of enzymes: there was an increase in the activity in non-sedimentary (cytoplasmic) fraction due to intracellular redistribution of enzymes. There is found inverse correlation between the content of oxidative carbonylation products of proteins and the activity of cathepsins in the non-sedimentary fraction, as well as the proportion of their non-sedimentary activity. **Conclusions.** 1. Arginine at a dose of 500 mg/kg at a 10-day administration completely corrects the increase in the products of oxidative protein carbonylation that develops in experimental hyperhomocysteinemia. 2. Under the influence of arginine there is an increase in the reduced due to isolated hyperhomocysteinemia activity of cathepsins B, L, H in the cytoplasmic fraction of the liver and kidney due to intracellular redistribution of enzymes. 3. Arginine administration causes non-selective increase of the lysosomal membrane permeability, and as a result, changes in the compartmentalization of lysosomal cysteine proteases. 4. The inverse correlation of the level of protein oxidative modification products with the activity of cathepsins in cytoplasmic (nonsedimentary) fractions, and the proportions of their nonsedimentary activity, suggesting the presence of contribution of changes in the compartmentalization of lysosomal cysteine proteinases in developing under the action of arginine compensation of oxidative stress in experimental hyperhomocysteinemia.

Keywords: hyperhomocysteinemia, arginine, cathepsins B, L, H, oxidative modification of proteins.

Гомоцистеин является промежуточным продуктом цикла обмена метионина и обладает выраженным цитотоксическим действием, в том числе за счет провокации образования свободных радикалов, влекущего за собой развитие оксидативного стресса [1]. В настоящее время в качестве наиболее значимого проявления оксидативного стресса рассматривается окислительная модификация белков, поскольку данный процесс не только вызывает образование стабильных и удобных для измерения и последующей трактовки маркеров, но и существенно меняет разнообразные функции этих биомолекул [2], приводя к ранее трудно объяснимым нарушениям функций клеток и тканей на фоне свободно-радикальной патологии. Наибольшее значение придается необратимому окислению белков с образованием карбонильных производных [3]. Такие белки утрачивают нативные функции и формируют агрегаты, подлежащие деградации. В качестве агентов такой деградации могут выступать различные виды клеточных и внеклеточных протеиназ, в том числе лизосомальные. Наибольший интерес здесь представляют лизосомальные цистеиновые протеиназы из-за доказанной способности не только расщеплять захваченные в ходе эндоцитоза белки, но и перемещаться в цитоплазму сквозь избыточно проницаемую по разным причинам лизосомальную мембрану [4]. Следует отметить, что несмотря на значительное количество работ, увязывающих повышение уровня гомоцистеина в крови с развитием различных патологических состояний, детализация механизмов тканевых изменений остается актуальной. Поскольку в предшествующих исследованиях нами были обнаружены изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемости лизосомальных мембран в миокарде на фоне гипергомоцистеинемии и продемонстрировано корректирующее действие аргинина на указанные процессы [5], целью данного исследования стала оценка влияния аргинина на активность и внутри-

клеточное распределение катепсинов В, L, Н в ткани печени, почки и легкого при экспериментальной гипергомоцистеинемии и развивающегося на ее фоне окислительного повреждения белков.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 32 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии *Wistar*. Содержание и выведение животных из эксперимента осуществлялось в соответствии с протоколами, изложенными Международным Советом Медицинских Научных Обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и правилами лабораторной практики – Приложение к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708н.

Моделирование выраженной гипергомоцистеинемии [6] проводили внутрижелудочным введением метионина в качестве субстрата для синтеза гомоцистеина в виде суспензии, приготовленной на 1% крахмальном растворе с добавлением 10% твина-80, в дозе 1,5 г/кг ежедневно 2 раза в сутки в течение 21 дня (n=8). Суспензия вводилась экспериментатором с участием ассистента с помощью стеклянного градуированного шприца с зондом. Объем вводимой суспензии зависит от массы животного и не превышает 1,5 мл. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

Животным контрольной группы (n=8), контроль 1, таким же образом внутрижелудочно вводилась суспензия, не содержащая метионин (состав по массе: 10% твина-80, 1% крахмала, 89% воды) в течение 21 дня. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

Для изучения эффектов аргинина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии выборке животных (n=8) вводили аргинин per os 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток [7] параллельно с введением метионина по

схеме, описанной выше (с 12 по 21 сутки введения метионина).

Животным контрольной группы ($n=8$) осуществляли введение аргинина *per os* 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток параллельно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше – контроль 2. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

При выведении животных из эксперимента эвтаназия осуществлялась под эфирным наркозом обескровливанием при сохраненном дыхании и сердцебиении, после чего немедленно извлекались печень, почка и легкое. Органы раздельно помещали в охлажденный 0,25 М раствор сахарозы, очищали от остатков жировой и соединительной ткани, промывали средой выделения и готовили точные навески с использованием электронных весов (AJH-220 SE, Япония). Гомогенизация тканей осуществлялась в холодном 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1:10 на гомогенизаторе «Potter S» (Sartorius, Германия) в стеклянном стакане тefлоновым пестиком при зазоре 0,16-0,24 мм. Скорость вращения составляла 1000 об/мин для почки и легкого и 900 об/мин для печени, время гомогенизации – 50 и 35 секунд соответственно.

Субклеточное фракционирование полученных гомогенатов осуществляли последовательным центрифугированием: 15 мин при 800 g для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер, 15 мин при 14000 g для удаления митохондрий и 30 мин при 20000 g для осаждения лизосом. Полученный при заключительном центрифугировании супернатант представлял собой цитоплазматическую (неседиментируемую) фракцию гомогената, осадок (седиментируемая фракция) – грубую фракцию лизосом. Для проведения дальнейших исследований осадок ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1%.

Концентрацию гомоцистеина определяли в сыворотке крови коммерческим набором «AxisShield» (США) методом

иммуоферментного анализа, концентрацию белка в неседиментируемой и седиментируемой фракциях гомогенатов – по методу Лоури коммерческим набором НПЦ «Эко-сервис» (Россия, СПб).

Для оценки выраженности окислительной модификации белков осуществляли измерение уровня карбонильных производных в неседиментируемой фракции гомогенатов по R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой спонтанном и металл-индуцированном варианте [8] с регистрацией продуктов реакции (динитрофенилгидразонов) на спектрофотометре (СФ-2000, Россия, СПб) в ультрафиолетовой и видимой части спектра. Для анализа полученных результатов использовался способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков [9]. Результаты выражали в единицах оптической плотности (е.о.п.) на грамм белка. Оценка резервно-адаптационного потенциала (РАП) [10] осуществлялась с использованием значений общих площадей под кривой спектра поглощения карбонильных производных, результат выражали в процентах.

Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ – катепсинов В, L и Н – изучалась раздельно в седиментируемой и неседиментируемой фракциях гомогенатов спектрофлуориметрическим методом [11] с регистрацией продукта реакции (7-амидо-4-метилкумарина) на спектрофлуориметре System 3 Scanning Spectrofluorometr (Optical technology devices, inc. Elmstord, New York, 10523). Удельную активность ферментов выражали в нкат/г белка и обозначали НСА (для неседиментируемой фракции) и СА (для седиментируемой). Общая активность в гомогенате (ОА) рассчитывалась как сумма НСА и СА для каждого фермента.

Для оценки компартиментализации катепсинов использовали значение доли внелизосомальной активности (НСА%), которую рассчитывали как процентное соотношение неседиментируемой активности соответствующего фермента к его общей активности.

Аутокаталитическое действие катепсинов оценивалось по коэффициенту от-

ношения значения активности каждого фермента после 15-минутной прекаталитической инкубации к параллельно определяемому значению активности без преинкубации [12] ($K_{аса}$ – коэффициент аутокаталитического действия).

В качестве дополнительного маркера стабильности лизосомальной мембраны в седиментируемой и неседиментируемой фракциях гомогенатов определяли активность кислой фосфатазы (суммарную и тартрат-стабильную) с использованием коммерческого набора «Витал Диагностикс СПб» (Россия, СПб), активность тартрат-чувствительной фракции определяли как разницу между суммарной и тартрат-стабильной активностью.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica 10.0. Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Поскольку отмечалось отсутствие согласия большинства данных с нормальным распределением, в качестве характеристик использовали медиану (Me), верхний и нижний квартили (Q1 и Q3 соответственно), результаты представляли в формате Me [Q1;Q3], для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест). Оценку ранговой корреляции осуществляли с помощью коэффициента Спирмена.

Результаты и их обсуждение

Измерение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови продемонстрировало значительное нарастание показателя у животных, получавших метионин, относительно контрольной группы 1 (293,10 [273,10; 318,20] мкмоль/л и 5,90 [5,50; 6,70] мкмоль/л соответственно, $p=0,001$). При этом у животных, получавших аргинин на фоне метионина, данный показатель составил 92,80 [58,75; 112,07], что статистически значимо ниже показателей,

обнаруженных для группы с изолированным введением метионина ($p=0,001$), но существенно выше значений контрольной группы 2 (5,87 [5,65; 6,77], $p=0,002$).

Данные, полученные в результате комплексной оценки состояния окислительной модификации белков в изучаемых тканях (табл. 1) демонстрируют, что на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии формируется статистически значимое повышение общего содержания окислительно карбонилированных белков в печени и почке ($S_{общ}$) за счет статистически значимого повышения содержания альдегидных форм динитрофенилгидразонов, считающихся первичными маркерами окислительного повреждения белков [13]. Таким образом, подтверждается тезис о роли гомоцистеина в качестве провокатора окислительного стресса для указанных тканей, кроме того, наши данные согласуются с полученными ранее аналогичными результатами для миокарда [14]. Однако следует отметить, что, в отличие от миокарда, ткань печени и почек не продемонстрировала ни статистически значимых изменений вторичных маркеров окислительного повреждения белков (КДНФГ), ни изменений показателя РАП. Таким образом, несмотря на явные признаки развития окислительного стресса для ткани печени и почек на фоне гипергомоцистеинемии, его степень для данных тканей не столь выражена, как для сердечной мышцы. Причиной может оказаться как более развитая система антиоксидантной защиты, так и лучшая утилизация первично окислительно измененных белков.

Введение аргинина в дозе 500 мг/кг в течение 10 суток на фоне метионина привело к полной коррекции выявленных изменений, приблизив показатели состояния окислительного карбонилирования белков к значениям соответствующего контроля и сформировав статистически значимые снижения уровней $S_{общ}$ и $S_{АДНФГсумм}$ относительно группы, получавшей метионин.

Таблица 1

Результаты комплексной оценки состояния окислительной модификации белков в экспериментальных и контрольных группах (Me [Q₁; Q₃])

Показатель	Группа/орган		
	Контроль 1		
	Печень	Почка	Легкое
Собщ	2,87 [2,76;2,87]	2,22 [2,12;2,64]	2,10 [1,69;2,82]
S _{АДНФГ, CVMM}	2,34 [2,07;2,53]	1,83 [1,72;2,19]	1,61 [1,28;2,27]
S _{КДНФГ, CVMM}	0,60 [0,46;0,76]	0,41 [0,32;0,46]	0,47 [0,41;0,54]
РАП%	57,10 [49,50; 57,10]	50,00 [42,20; 54,50]	37,80 [35,80; 46,00]
	Метионин		
	Печень	Почка	Легкое
	Собщ	5,30 [4,25;5,50]*, p ₁ =0,003	3,58 [2,94;3,72]*, p ₁ =0,005
S _{АДНФГ, CVMM}	4,75 [3,85;5,16]*, p ₁ =0,002	2,93 [2,44;3,02]*, p ₁ =0,003	1,67 [1,51;2,11]
S _{КДНФГ, CVMM}	0,42 [0,35;0,52]	0,55 [0,40;0,71]	0,41 [0,39;0,53]
РАП%	58,10 [29,40;59,10]	48,8 [44,80; 67,90]	54,30 [44,80; 65,20]
	Контроль 2		
	Печень	Почка	Легкое
	Собщ	1,03 [0,99;1,07]	2,41 [1,06;3,90]
S _{АДНФГ, CVMM}	0,71 [0,69;0,73]	2,10 [0,66;3,38]	1,67 [1,57;1,98]
S _{КДНФГ, CVMM}	0,33 [0,28;0,35]	0,45 [0,41;0,54]	0,44 [0,40;0,55]
РАП%	24,5 [22,50;26,90]	54,50 [38,20;70,00]	49,60 [36,90;56,40]
	Метионин + аргинин		
	Печень	Почка	Легкое
	Собщ	1,46 [1,03;1,89]#, p ₂ =0,008	1,85 [1,45;2,42]#, p ₂ =0,047
S _{АДНФГ, CVMM}	1,21 [0,81;1,57]#, p ₂ =0,008	1,60 [1,31;1,93]#, p ₂ =0,03	1,26 [1,11;1,83]
S _{КДНФГ, CVMM}	0,25 [0,23;0,32]#, p ₂ =0,05	0,35 [0,23;0,50]	0,53 [0,38;0,63]
РАП%	67,10 [50,27;76,00]	76,30 [59,30;80,10]	54,30 [23,50;80,50]

Примечания: *, p₁ – статистические значимые отличия от соответствующего контроля, #, p₂ – статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин

При оценке изменений активности и внутриклеточного распределения лизосомальных цистеиновых протеиназ на фоне окислительного стресса, вызванного экспериментальной гипергомоцистеинемией и его коррекции аргинином, обнаружен ряд ткане- и энзимоспецифических тенденций.

Так, для катепсина В (табл. 2) наиболее яркие отличия обнаружены для ткани почки: активность фермента на фоне гипергомоцистеинемии статистически значимо снижалась как в лизосомальной (СА), так и в цитоплазматической (НСА) фракциях, формируя статистически значимое снижение общей активности (ОА).

При этом введение аргинина вызвало лишь нарастание активности фермента в цитоплазматической фракции, сформировав статистические значимые отличия в сторону повышения не только от показа-

телей группы, получавшей метионин, но и от соответствующего контроля. Отсутствие статистически значимых отличий общей активности фермента в сочетании со значительным нарастанием показателя доли неседиментируемой активности (НСА%) подчеркивает, что причиной является изменение компарментализации с интенсификацией выхода фермента из лизосомальной в цитоплазматическую фракцию, в том числе для утилизации окислительно поврежденных белков. В ткани печени на фоне гипергомоцистеинемии также присутствует тенденция к снижению активности катепсина В, однако статистически значимые изменения получены только для неседиментируемой активности. Интересно, что введение аргинина в данном случае не только не корректирует, но даже усугубляет выявленные измене-

Таблица 2

**Изменения активности и компартиментализации лизосомальных
цистеиновых протеиназ в экспериментальных и контрольных группах:
катепсин В (Me [Q₁; Q₃])**

Показатель	Группа/орган		
	Контроль 1		
	Печень	Почка	Легкое
ОА, нкат/г белка	0,43 [0,39;0,54]	0,93[0,85;1,12]	0,14 [0,12;0,17]
СА, нкат/г белка	0,41 [0,38;0,52]	0,88[0,81;1,08]	0,14 [0,12;0,16]
НСА, нкат/г белка	0,020 [0,015;0,024]	0,045 [0,042;0,047]	0,003 [0,003;0,005]
НСА, %	4,30 [2,9;5,6]	4,9 [4,0;5,6]	2,6 [1,9;4,6]
	Метионин		
	Печень	Почка	Легкое
ОА, нкат/г белка	0,37 [0,29;0,43]	0,64 [0,50;0,81]*, p ₁ =0,01	0,16 [0,04;0,24]
СА, нкат/г белка	0,36 [0,29;0,42]	0,62 [0,48;0,79]*, p ₁ =0,02	0,16 [0,04;0,24]
НСА, нкат/г белка	0,007 [0,005;0,011]*, p ₁ =0,01	0,020 [0,016;0,022]*, p ₁ =0,002	0,003 [0,001;0,003]
НСА, %	2,4 [1,2;3,2]	3,2 [2,6;4,6]	1,7 [1,1;3,1]
	Контроль 2		
	Печень	Почка	Легкое
ОА, нкат/г белка	0,34 [0,30;0,40]	1,36 [0,68;2,07]	0,94 [0,81;1,06]
СА, нкат/г белка	0,33 [0,29;0,38]	1,31 [0,62;2,02]	0,93 [0,80;1,05]
НСА, нкат/г белка	0,011 [0,010;0,012]	0,058 [0,050;0,067]	0,011 [0,010;0,012]
НСА, %	3,0 [2,7;3,4]	4,0 [2,8;9,5]	0,9 [0,7;1,4]
	Метионин + аргинин		
	Печень	Почка	Легкое
ОА, нкат/г белка	0,23 [0,20;0,24]*, p ₁ =0,005	0,59 [0,50;0,67]	0,98 [0,92;1,13]#, p ₂ =0,002
СА, нкат/г белка	0,22 [0,20;0,24]*, p ₁ =0,005	0,51 [0,43;0,59]	0,97 [0,92;1,12]#, p ₂ =0,002
НСА, нкат/г белка	0,005 [0,005;0,006]*, p ₁ =0,005	0,072 [0,071;0,088]*#, p ₁ =0,01, p ₂ =0,002	0,005 [0,002;0,008]
НСА, %	2,3 [2,0;2,6]*, p ₁ =0,05	13,8 [11,3;14,3]#, p ₂ =0,002	0,4 [0,1;1,1]#, p ₂ =0,05

Примечание: *, p₁ – статистические значимые отличия от соответствующего контроля, #, p₂ – статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин

ния, статистически значимо отдаляя значения показателей от значений контрольной группы без статистически значимых отличий от группы с изолированной гипергомоцистеинемией.

Изменения активности и компартиментализации катепсина L (табл. 3) при экспериментальной гипергомоцистеинемии оказались аналогичными катепсину В, но гораздо более выраженными. Так, статистически значимое снижение показателей НСА, СА и ОА катепсина L обнаружено как для ткани почки, так и для печени, при этом снижение активности в цитоплазматической фракции в обоих случаях

оказалось более выраженным, чем для лизосомальной, что подтверждается статистически значимыми снижениями доли неседиментируемой активности.

Применение аргинина вновь не корректирует изменений общей и лизосомальной активности катепсина L в ткани печени, однотипно катепсину В, однако вызывает перераспределение фермента в цитоплазматическую фракцию, приводя к статистически значимому повышению неседиментируемой активности катепсина L и ее доли относительно группы, получавшей изолированно метионин. В ткани почки же введение аргинина на фоне метио-

Таблица 3

**Изменения активности и компартиментализации лизосомальных
цистеиновых протеиназ в экспериментальных и контрольных группах:
катепсин L (Me [Q₁; Q₃])**

Показатель	Группа/орган		
	Контроль 1		
	Печень	Почка	Легкое
ОА, нкат/г белка	1,70 [1,19;2,10]	2,03 [1,90;2,27]	1,65 [1,45;1,84]
СА, нкат/г белка	1,64 [1,14;2,03]	1,97 [1,83;2,18]	1,64 [1,40;1,83]
НСА, нкат/г белка	0,063 [0,061;0,066]	0,071 [0,068;0,079]	0,019 [0,014;0,026]
НСА, %	3,9 [3,1;5,1]	3,8 [3,1;4,0]	1,3 [0,8;1,5]
	Метионин		
	Печень	Почка	Легкое
	ОА, нкат/г белка	1,12 [0,93;1,22]*, p ₁ =0,04	0,66 [0,55;0,74]*, p ₁ =0,001
СА, нкат/г белка	1,10 [0,91;1,21]	0,66 [0,54;0,73]*, p ₁ =0,001	2,01 [1,72;2,31]
НСА, нкат/г белка	0,019 [0,010;0,025]*, p ₁ =0,001	0,009 [0,007;0,013]*, p ₁ =0,001	0,021 [0,006;0,035]
НСА, %	2,0 [0,8;2,4]*, p ₁ =0,001	1,2 [1,1;1,6]*, p ₁ =0,001	0,9 [0,4;1,8]
	Контроль 2		
	Печень	Почка	Легкое
	ОА, нкат/г белка	1,16 [1,03;1,28]	2,92 [2,37;4,12]
СА, нкат/г белка	1,12 [0,99;1,25]	2,83 [2,30;4,06]	1,68 [1,30;2,15]
НСА, нкат/г белка	0,037 [0,028;0,042]	0,075 [0,071;0,084]	0,024 [0,020;0,026]
НСА, %	3,1 [2,5;3,4]	2,8 [1,9;3,5]	1,2 [0,9;1,4]
	Метионин + аргинин		
	Печень	Почка	Легкое
	ОА, нкат/г белка	1,23 [1,00;1,27]	1,89 [1,82;1,94]*#, p ₁ =0,02, p ₂ =0,002
СА, нкат/г белка	1,18 [0,95;1,23]	1,81 [1,75;1,86]*#, p ₁ =0,01, p ₂ =0,002	1,50 [1,30;1,98]
НСА, нкат/г белка	0,048 [0,040;0,054]*#, p ₂ =0,008	0,080 [0,074;0,084]*#, p ₂ =0,002	0,026 [0,016;0,034]
НСА, %	4,0 [3,1;5,4]*#, p ₂ =0,002	4,0 [3,9;4,3]*#, p ₁ =0,005, p ₂ =0,01	1,6 [1,0;2,5]

Примечания: *, p₁ – статистические значимые отличия от соответствующего контроля, #, p₂ – статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин

нина привело к частичной коррекции изменений общей и лизосомальной активности катепсина L: значения оказались статистически выше таковых для группы, получавшей изолированно метионин, но статистически значимо ниже, чем в соответствующей контрольной группе. При этом изменения активности фермента в неседиментируемой фракции оказались скорректированы полностью, причиной вновь можно считать перераспределение фермента: доля неседиментируемой активности статистически значимо нарастает не только относительно группы с экспери-

ментальной гипергомоцистеинемией, но и относительно соответствующего контроля. Изменения активности и распределения катепсина H (табл. 4) в ткани печени практически повторяют обнаруженные для катепсина L, единственным отличием является неполная коррекция снижения неседиментируемой активности аргинином. При этом в ткани почки на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии мы обнаружили повышение общей активности фермента, однако эти изменения произошли за счет лизосомальной фракции, доля неседиментируемой активности оказалась

Таблица 4

**Изменения активности и компартиментализации лизосомальных
цистеиновых протеиназ в экспериментальных и контрольных группах:
катепсин Н (Me [Q₁; Q₃])**

Показатель	Группа/орган		
	Контроль 1		
	Печень	Почка	Легкое
ОА, нкат/г белка	0,75 [0,56;0,83]	1,63 [1,26;2,29]	1,24 [1,11;1,46]
СА, нкат/г белка	0,70 [0,52;0,78]	1,57 [1,21;2,24]	1,21 [1,08;1,42]
НСА, нкат/г белка	0,048 [0,037;0,059]	0,044 [0,043;0,070]	0,039 [0,024;0,044]
НСА, %	7,1 [6,4;7,3]	3,5 [2,3;4,3]	2,9 [2,6;3,1]
	Метионин		
	Печень	Почка	Легкое
	ОА, нкат/г белка	0,50 [0,44;0,54]*, p ₁ =0,01	2,64 [2,52;2,78]*, p ₁ =0,02
СА, нкат/г белка	0,47 [0,41;0,51]*, p ₁ =0,02	2,60 [2,48;2,75]*, p ₁ =0,01	1,43 [1,16;1,75]
НСА, нкат/г белка	0,028 [0,025;0,030]*, p ₁ =0,004	0,038 [0,032;0,051]	0,024 [0,022;0,031]
НСА, %	5,6 [5,0;6,3]*, p ₁ =0,01	1,5 [1,2;2,0]*, p ₁ =0,02	2,0 [1,1;2,5]
	Контроль 2		
	Печень	Почка	Легкое
	ОА, нкат/г белка	1,06 [0,91;1,26]	3,49 [3,27;4,14]
СА, нкат/г белка	0,98 [0,84;1,18]	3,40 [3,20;4,07]	3,24 [2,79;3,47]
НСА, нкат/г белка	0,081 [0,073;0,087]	0,080 [0,071;0,084]	0,094 [0,083;0,097]
НСА, %	7,6 [6,9;7,8]	2,2 [1,8;2,5]	2,8 [2,6;3,0]
	Метионин + аргинин		
	Печень	Почка	Легкое
	ОА, нкат/г белка	0,93 [0,89;1,08]#, p ₂ =0,002	3,01 [2,97;3,05]#, p ₂ =0,05
СА, нкат/г белка	0,85 [0,83;1,00]#, p ₂ =0,002	2,92 [2,88;2,96]	2,26 [2,01;2,41]*#, p ₁ =0,008, p ₂ =0,01
НСА, нкат/г белка	0,070 [0,068;0,072]*#, p ₁ =0,05, p ₂ =0,002	0,088[0,084;0,090]*#, p ₁ =0,05, p ₂ =0,002	0,069[0,061;0,077]*#, p ₁ =0,02, p ₂ =0,002
НСА, %	7,3 [6,4;8,2]#, p ₂ =0,02	2,9 [2,8;3,0]#, p ₂ =0,002	3,0 [2,8;3,3]#, p ₂ =0,02

Примечание: *, p₁ – статистические значимые отличия от соответствующего контроля, #, p₂ – статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин

статистически значимо ниже контрольных значений. Применение аргинина привело, тем не менее, к дополнительному повышению общей активности фермента, которая статистически значимо превысила значения для группы с изолированным введением метионина, приблизившись к значениям соответствующего контроля. Особенно выраженными оказались изменения неседиментируемой активности, статистически значимо превысившие не только значения, полученные для группы с изолированным введением метионина, но и показатели контрольной группы. Наличие вклада в выявленные изменения внутриклеточного перераспределения фермента подтвержда-

ется статистически значимым повышением значения доли цитоплазматической фракции относительно группы с экспериментальной гипергомоцистеинемией.

Интересно, что ткань легкого продемонстрировала устойчивость к развитию оксидативного стресса при экспериментальной гипергомоцистеинемии и отсутствие изменений показателей окислительного повреждения белков сопровождалось для этой ткани отсутствием изменений активности и внутриклеточного распределения лизосомальных цистеиновых протеиназ.

При оценке связи показателей окислительного карбонилирования белков и активности/распределения катепсинов для

изучаемых моделей наиболее яркие тенденции были получены для ткани почки, где и в целом изменения значений также оказались более выраженными (табл. 5). Для всех изучаемых ферментов получены статистически значимые обратные корреляционные связи общего содержания карбонилированных белков и первичных мар-

керов окислительного повреждения протеинов с показателями неседиментируемой активности всех изучаемых катепсинов и значениями доли цитоплазматической фракции как всех катепсинов, так и кислой фосфатазы. Степень корреляционной связи во всех случаях оказалась от средней (0,55) до высокой (0,87).

Таблица 5

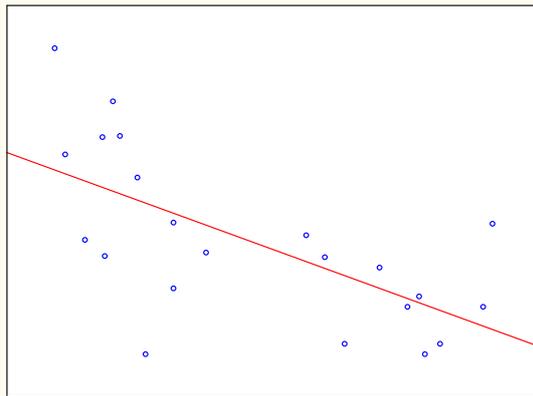
Корреляционный анализ связей показателей активности и распределения лизосомальных цистеиновых протеиназ ткани почки с маркерами окислительного повреждения белков

	$S_{\text{общ}}$		$S_{\text{АДНФГ, сумм}}$	
	R	p	R	p
Катепсин В ОА	-0,30	0,168	-0,25	0,255
Катепсин L ОА	-0,57	0,005	-0,57	0,006
Катепсин Н ОА	-0,0006	0,998	-0,11	0,618
Катепсин В СА	-0,26	0,244	-0,20	0,370
Катепсин L СА	-0,57	0,005	-0,57	0,006
Катепсин Н СА	0,04	0,865	-0,07	0,749
Катепсин В НСА	-0,72	0,0002	-0,74	0,00008
Катепсин L НСА	-0,58	0,005	-0,65	0,001
Катепсин Н НСА	-0,57	0,01	-0,65	0,001
Катепсин В НСА%	-0,55	0,008	-0,61	0,002
Катепсин L НСА%	-0,48	0,023	-0,56	0,006
Катепсин Н НСА%	-0,58	0,005	-0,59	0,004
КФ сумм НСА%	-0,83	0,000002	-0,84	0,000001
КФ тч НСА%	-0,69	0,0004	-0,71	0,0002
КФ тс НСА%	-0,87	0,0000001	-0,85	0,0000004

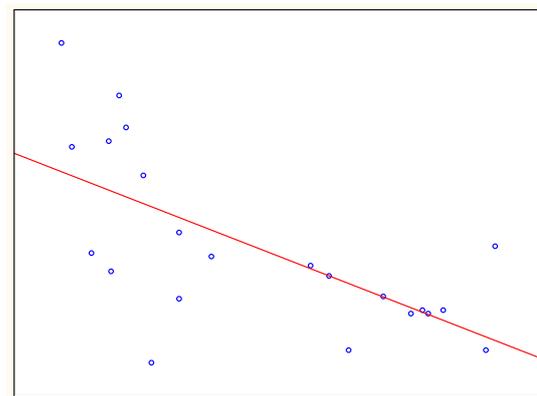
В ткани печени статистически значимые корреляционные связи с показателями окислительного повреждения белков были получены только для активности катепсина Н: неседиментируемая активность продемонстрировала обратную корреляционную связь средней степени (рис. 1), седиментируемая и общая активность – обратную корреляционную связь высокой степени (рис. 2, 3). При этом для доли цитоплазматической фракции получены обратные корреляционные связи в отношении катепсина В (-0,55, $p=0,01$ с $S_{\text{общ}}$; -0,56, $p=0,01$ с $S_{\text{АДНФГ, сумм}}$), катепсина L (-0,49, $p=0,02$ с $S_{\text{общ}}$; -0,47, $p=0,03$ с $S_{\text{АДНФГ, сумм}}$) и тартратчувствительной кислой фосфатазы (-0,46, $p=0,03$ с $S_{\text{общ}}$; -0,45, $p=0,04$ с $S_{\text{АДНФГ, сумм}}$). Полученные результаты подтверждают наличие связи между изменением активности лизосомальных ферментов и их перерас-

пределением в цитоплазматическую фракцию с уровнем окислительного повреждения белков. Обратный характер корреляций можно считать частным подтверждением общего тезиса об ингибиторном влиянии окислительной модификации белков на их функции, в том числе энзиматическую. Одновременно, наличие подобных связей позволяет сделать предположение о том, что формирующаяся под влиянием аргинина коррекция показателей окислительной модификации белков может в качестве одной из причин иметь развивающееся одновременно перемещение лизосомальных цистеиновых протеиназ в цитоплазматическую фракцию.

Следует отметить, что обнаруженные в изучаемых моделях изменения активности катепсинов преимущественно в сторону снижения на фоне развивающегося окисли-

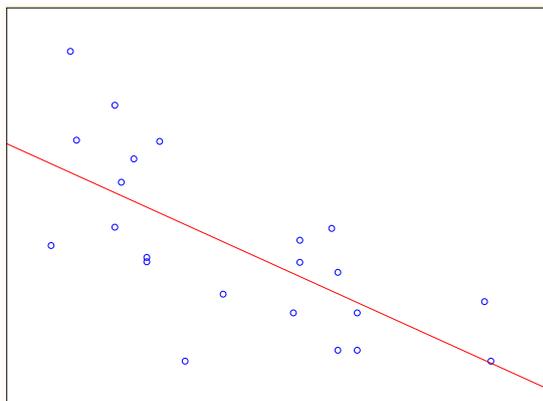


НСА катепсина Н / $S_{\text{общ}}$
($p=0,001$)

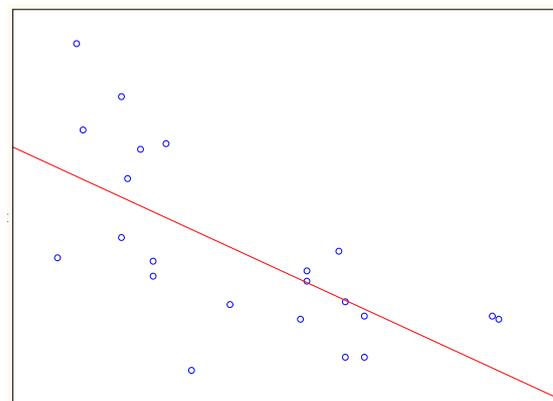


НСА катепсина Н / $S_{\text{АДНФГ, сумм}}$
($p=0,001$)

Рис. 1. Корреляционные связи неседиментируемой активности катепсина Н печени с показателями окислительного карбонилирования белков

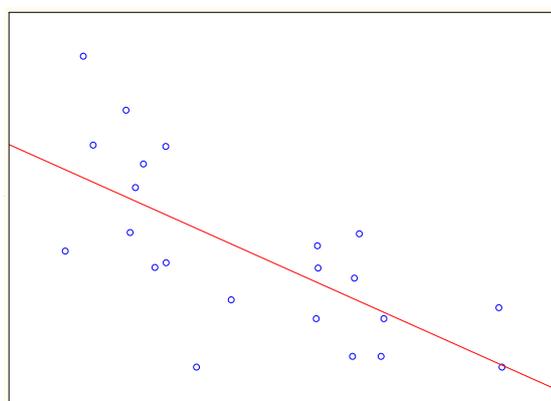


СА катепсина Н / $S_{\text{общ}}$
($p=0,00005$)

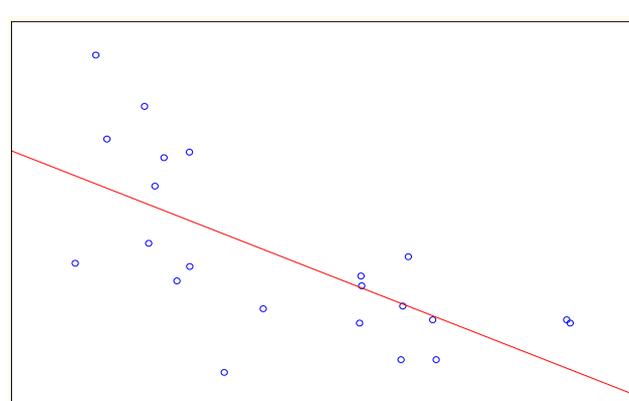


СА катепсина Н / $S_{\text{АДНФГ, сумм}}$
($p=0,00005$)

Рис. 2. Корреляционные связи седиментируемой активности катепсина Н печени с показателями окислительного карбонилирования белков



ОА катепсина Н / $S_{\text{общ}}$
($p=0,00008$)



ОА катепсина Н / $S_{\text{АДНФГ, сумм}}$
($p=0,00008$)

Рис. 3. Корреляционные связи общей активности катепсина Н печени с показателями окислительного карбонилирования белков

тельного стресса при гипергомоцистеинемии и коррекция показателей аргинином могут объясняться не только снижением их синтеза из-за окислительного повреждения нуклеиновых кислот [15] либо снижением активности ферментов при их непосредственной окислительной модификации [16], но и изменением соотношения активных и проферментных форм. Для проверки последнего тезиса нами была предпринята оценка коэффициента аутокаталитического действия (Каса) изучаемых катепсинов (табл. 6), поскольку для них аутокаталитический процессинг описан в качестве механизма оперативного перевода зимогена в активную форму фермента [17-19].

Оказалось, что описанные выше многочисленные изменения активности катепсинов в ткани почки на фоне окислительного стресса при экспериментальной гипергомоцистеинемии не сопровождаются изменениями коэффициента аутокаталитического действия, что дает основания полагать, что соотношение активных и проферментных форм в данной модели роли не играет. При этом применение аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии приводит к статистически значимому снижению Каса в цитоплазматической фракции относительно контроля. Такие изменения могут говорить о существовании большей части протеиназ в активной форме, что в какой-то степени подтверждает ранее высказанное предположение о возможной роли выходящих из лизосом катепсинов в утилизации окислительно поврежденных белков как о возможном механизме коррекции аргинином изменений, вызванных экспериментальной гипергомоцистеинемией.

В ткани печени, однако, на фоне гипергомоцистеинемии получено статистически значимое нарастание показателя Каса для неседиментируемой активности катепсина В, что позволяет предполагать, что описанное выше снижение его активности в цитоплазматической фракции может иметь причиной замедление созревания зимогенов; для остальных показателей

статистически значимых отличий не получено. Интересно, что применение аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии, приводя к дальнейшему снижению активности катепсина В в цитоплазматической фракции, вызывает и дальнейшее значительное нарастание Каса. Выявленные ранее изменения активности катепсинов L и H в ткани печени для изучаемых моделей не сопровождались статистически значимыми изменениями Каса, что не дает оснований предполагать наличие вклада изменения соотношения проферментных и активных форм в обнаруженные сдвиги. Однако введение аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии привело к статистически значимому снижению показателя Каса в неседиментируемой фракции как относительно группы с введением метионина, так и относительно контроля, что указывает на то, что обнаруженная частичная коррекция сниженной на фоне окислительного стресса активности данного фермента в цитоплазматической фракции может быть связана с увеличением доли активных форм.

Интересной находкой мы считаем обнаружение изменений показателя Каса для ткани легкого. Хотя, согласно ранее представленным данным, данная ткань не демонстрирует изменений показателей окислительного повреждения белков и активности катепсинов, оказалось, что развитие экспериментальной гипергомоцистеинемии приводит к статистически значимому повышению показателя Каса для катепсинов L и H в неседиментируемой фракции, а введение аргинина возвращает показатели к контрольным значениям. Таким образом, при экспериментальной гипергомоцистеинемии данная ткань характеризуется увеличением доли неактивных форм без статистически значимого снижения активности, что можно трактовать, как компенсаторное нарастание синтеза и вывода в цитоплазму указанных катепсинов, создающее в итоге резистентность к повышению уровня окислительно поврежденных белков.

Таблица 6

Значения коэффициента аутокаталитического действия катепсинов В, L, Н
в экспериментальных и контрольных группах (Ме [Q₁; Q₃])

Показатель	Группа/орган		
	Контроль 1		
	Печень	Почка	Легкое
Катепсин В, НСА	0,18 [0,12;0,40]	1,01 [0,79;1,17]	0,49 [0,49;0,97]
Катепсин В, СА	0,47 [0,14;0,71]	0,97 [0,68;1,09]	0,76 [0,67;0,97]
Катепсин L, НСА	0,80 [0,74;0,83]	0,87 [0,76;0,95]	0,62 [0,31;0,86]
Катепсин L, СА	0,83 [0,72;1,28]	0,95 [0,88;1,02]	0,84 [0,66;1,14]
Катепсин H, НСА	0,63 [0,35;0,79]	0,87 [0,81;1,19]	0,49 [0,37;0,54]
Катепсин H, СА	0,60 [0,40;0,80]	0,89 [0,86;0,94]	0,25 [0,18;0,47]
	Метионин		
	Печень	Почка	Легкое
Катепсин В, НСА	0,73 [0,46;0,98]*, p ₁ =0,03	0,95 [0,77;1,12]	0,81 [0,61;0,98]
Катепсин В, СА	0,68 [0,58;0,91]	0,81 [0,63;0,96]	0,49 [0,33;1,22]
Катепсин L, НСА	1,04 [0,56;1,12]	0,90 [0,65;1,53]	1,16 [0,85;3,99]*, p ₁ =0,03
Катепсин L, СА	0,67 [0,54;0,81]	0,90 [0,82;1,08]	1,03 [0,94;1,16]
Катепсин H, НСА	0,49 [0,44;0,6]	0,89 [0,82;0,95]	0,70 [0,60;0,78]*, p ₁ =0,02
Катепсин H, СА	0,37 [0,30;0,61]	0,91 [0,83;0,95]	0,39 [0,31;0,49]
	Контроль 2		
	Печень	Почка	Легкое
Катепсин В, НСА	1,20 [0,82;1,47]	1,42 [1,36;1,60]	0,35 [0,32;0,37]
Катепсин В, СА	1,36 [1,15;1,75]	1,47 [0,74;3,78]	1,18 [0,88;1,22]
Катепсин L, НСА	0,81 [0,71;0,83]	1,02 [0,94;1,26]	0,58 [0,53;0,65]
Катепсин L, СА	0,75 [0,62;0,85]	0,96 [0,76;1,06]	0,77 [0,69;1,10]
Катепсин H, НСА	0,67 [0,52;0,77]	1,19 [1,06;1,33]	0,62 [0,55;0,63]
Катепсин H, СА	0,44 [0,35;0,53]	0,80 [0,72;0,97]	0,38 [0,35;0,41]
	Метионин + аргинин		
	Печень	Почка	Легкое
Катепсин В, НСА	1,45[1,26;1,61]#, p ₂ =0,02	0,84[0,81;1,02]*, p ₁ =0,005	1,2[0,98;2,2]*, p ₁ =0,02
Катепсин В, СА	0,69[0,50;0,82]*, p ₁ =0,005	1,44[1,08;1,62]	0,90[0,84;1,02]
Катепсин L, НСА	0,60[0,58;0,67]	0,87[0,86;0,89]*, p ₁ =0,02	0,31[0,08;0,59]#, p ₂ =0,008
Катепсин L, СА	0,61[0,55;0,72]	0,8[0,77;1,09]	0,89[0,82;1,08]
Катепсин H, НСА	0,27[0,25;0,29]*#, p ₁ =0,008, p ₂ =0,005	0,99[0,98;1,03]*, p ₁ =0,05	0,48[0,33;0,6]#, p ₂ =0,05
Катепсин H, СА	0,25[0,20;0,36]	0,62[0,50;0,81]	0,33[0,33;0,34]

Примечания: *, p₁ – статистические значимые отличия от соответствующего контроля, #, p₂ – статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин

Достаточно однотипные изменения компартиментализации изучаемых катепсинов при окислительном стрессе, вызванном экспериментальной гипергомоцистеинемией и, особенно, его коррекции аргинином дают основания предполагать наличие универсального механизма перераспределения ферментов из лизосом в цитоплазму. Наиболее вероятной причиной здесь представляется общее повышение проницаемости лизосомальной мембраны

на фоне оксидативного стресса [20]. Данное предположение подтверждается результатами оценки доли неседиментируемой фракции для маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы (табл. 7): на фоне введения аргинина наблюдается статистически значимое нарастание показателей относительно группы с изолированным введением метионина не только для ткани почки, где значения при гипергомоцистеинемии оказались статистически зна-

чимо снижены, но и для печени, не продемонстрировавшей изначально статистически значимых отличий. При этом ткань легкого на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии оказалась единственной, показавшей значительное повышение суммарной активности кислой фосфатазы в группе, получавшей метионин, что может быть результатом компенсаторного увеличения количества лизосом в этой ткани и соотносится с ранее высказанным предположением о компенсаторном увеличении

синтеза катепсинов. Возможно, именно этот процесс создал резистентность ткани легкого к формированию окислительного повреждения белков и суммарному отсутствию видимых изменений активности катепсинов. При этом на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии доля цитоплазматической активности суммарной и тартрат-чувствительной кислой фосфатазы в ткани легкого снижается, введение аргинина приводит к нарастанию показателя НСА% для тартрат-чувствительной фракции.

Таблица 7

Изменения активности и компартиментализации фракций кислой фосфатазы в экспериментальных и контрольных группах (Me [Q₁; Q₃])

Показатель	Группа/орган		
	Контроль 1		
	Печень	Почка	Легкое
КФ _{СУММ} , нкат/г белка	310,2 [303,3;333,9]	663,4 [629,8;859,3]	514,6 [424,9;607,9]
НСА% КФ _{СУММ}	6,2 [5,7;6,9]	4,2 [3,4;5,0]	2,0 [2,0;2,6]
НСА% КФ _{ТЧ}	3,0 [2,7;3,7]	2,8 [2,0;3,5]	2,8 [2,0;3,5]
НСА% КФ _{ТС}	10,4 [9,0;11,6]	5,8 [3,9;7,0]	2,3 [1,8;2,7]
	Метионин		
	Печень	Почка	Легкое
	КФ _{СУММ} , нкат/г белка	313,5 [298,5;362,6]	742,8 [643,8;862,00]
НСА% КФ _{СУММ}	6,0 [5,2;6,3]	1,8 [1,6;2,0]*, p ₁ =0,003	1,4 [1,0;1,6]*, p ₁ =0,005
НСА% КФ _{ТЧ}	3,9 [2,4;5,1]	1,4 [0,9;1,7]*, p ₁ =0,007	0,9 [0,2;1,1]*, p ₁ =0,005
НСА% КФ _{ТС}	7,6 [6,0;9,6]	2,3 [1,6;2,5]*, p ₁ =0,004	1,9 [1,1;2,6]
	Контроль 2		
	Печень	Почка	Легкое
	КФ _{СУММ} , нкат/г белка	204,7 [187,8;247,3]	591,1 [509,9;678,4]
НСА% КФ _{СУММ}	5,2 [4,6;7,1]	3,9 [3,5;4,3]	1,9 [1,7;2,5]
НСА% КФ _{ТЧ}	4,4 [3,7;5,2]	3,7 [2,9;4,0]	1,9 [1,4;4,6]
НСА% КФ _{ТС}	5,3 [5,1;7,7]	4,1 [3,4;4,8]	2,1 [1,8;2,2]
	Метионин + аргинин		
	Печень	Почка	Легкое
	КФ _{СУММ} , нкат/г белка	309,9[271,5;328,1]*, p ₁ =0,02	382,2[365,3;397,9]*#, p ₁ =0,005, p ₂ =0,002
НСА% КФ _{СУММ}	7,0 [6,5;8,3]#, p ₂ =0,03	4,7 [4,5;4,8]*#, p ₁ =0,02, p ₂ =0,002	1,6 [1,5;1,7]
НСА% КФ _{ТЧ}	7,6 [7,5;8,5]*#, p ₁ =0,008, p ₂ =0,03	3,1 [2,9;3,2]#, p ₂ =0,002	2,4 [1,8;3,0]#, p ₂ =0,004
НСА% КФ _{ТС}	7,0 [5,9;8,3]	6,6 [5,9;7,2]*#, p ₁ =0,005, p ₂ =0,002	1,3 [1,0;1,5]*, p ₁ =0,008

Примечания: *, p₁ – статистические значимые отличия от соответствующего контроля, #, p₂ – статистически значимые отличия от группы, получавшей метионин

Выводы

1. Аргинин в дозе 500 мг/кг при 10-дневном введении полностью корректирует развивающееся на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии повышение продуктов окислительного карбонилирования белков.

2. Под действием аргинина происходит нарастание сниженной при изолированной гипергомоцистеинемии активности катепсинов В, L, Н в цитоплазматической фракции печени и почки за счет внутриклеточного перераспределения ферментов.

3. Изменения компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ

под действием аргинина происходят через вызываемое им неселективное повышение проницаемости лизосомальной мембраны.

4. Обнаружены обратные корреляционные связи содержания продуктов окислительной модификации белков с активностью катепсинов в цитоплазматической (неседиментируемой) фракции и долей их неседиментируемой активности, позволяющие предполагать наличие вклада изменения компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ в развивающуюся под действием аргинина компенсацию окислительного стресса на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии.

Литература

- Jakubowski H., Głowacki R. Chemical biology of homocysteinethiolactone and related metabolites // *Adv. Clin. Chem.* 2011. Vol. 55. P. 81-103. doi:10.1016/B978-0-12-387042-1.00005-8
- Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., и др. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // *Фундаментальные исследования.* 2010. №1. С. 74-78.
- Yan L.J. Analysis of oxidative modification of proteins // *Current Protocols in Protein Science.* 2009. Vol. 56, №1. P. 14.4.1-14.4.28.
- Пупышев А.Б. Пермеабилзация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор // *Цитология.* 2011. Т. 53, №4. С. 313-324.
- Ильичева А.С., Фомина М.А. Влияние L-аргинина и карнитина на активность катепсинов L, Н и проницаемость лизосомальной мембраны в сердечной мышце при выраженной гипергомоцистеинемии // *Казанский медицинский журнал.* 2015. Т. 96, №5. С. 819-824. doi:10.17750/KMJ2015-819
- Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2014. Т. 22, №4. С. 42-46.
- Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2008. Т. 71, №2. С. 29-31.
- Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты. СПб.: Издательство «Медицинская пресса», 2006.
- Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В., и др. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях. Патент РФ на изобретение №2524667. 27.07.2014. Бюл. № 21. Доступно по: http://www1.fips.ru/Archive/PAT/2014FULL/2014.07.27/INDEX_RU.HTM. Ссылка активна на 23 января 2018.
- Никитина Ю.В., Мухина И.В. Изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в раннем онтогенезе // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.* 2009. Т. 6, №1. С. 124-131.
- Barrett A.J., Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L // *Methods in Enzymol.* 1981. Vol. 80. P. 535-561.
- Борискина М.А. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у больных хроническими лейкозами в динамике заболевания: дис. ... канд. мед. наук. Рязань, 1996.
- Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л., и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях // *Современные проблемы токсикологии.* 2005. Т. 8, №3. С. 20-27.
- Ильичева А.С., Фомина М.А., Медведев Д.В. Характеристика продуктов окислительного повреждения белков миокарда на фоне гипергомоцистеинемии // *Наука мо-*

- лодых (Eruditio Juvenium). 2014. Т. 2, №4. С. 37-43.
15. Niu Y., Des Marais T.L., Tong Z., et al. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 82. P. 22-28.
 16. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease // *Clin. Chem.* 2006. Vol. 32. P. 601-623.
 17. Васильева О.С., Серебров В.Ю., Турк Б., и др. Изучение механизма аутокаталитической активации прокатепсина H in vitro // *Электронный журнал «Исследовано в России»*. 2002. С. 1092-1102. Доступно по: <http://docplayer.ru/31006556-Izuchenie-mehaniizma-autokataliticheskoy-aktivacii-prokatepsina-h-in-vitro.html>. Ссылка активна на 23 января 2018.
 18. Menard R., Carmona E., Takebe S., et al. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, №8. P. 4478-4484.
 19. Almeida P.C., Nantes I.L., Chagas J.R., et al. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 944-951.
 20. Terman A., Kurz T., Gustafsson B., et al. Lysosomal Labilization // *IUBMB Life.* 2006. Vol. 58, N9. P. 531-539. doi:10.1080/15216540600904885
- References**
1. Jakubowski H, Głowacki R. Chemical biology of homocystein ethiolactone and related metabolites. *Adv Clin Chem.* 2011;55:81-103. doi:10.1016/B978-0-12-387042-1.00005-8
 2. Muravleva LE, Molotov-Luchansky VB, Klyuyev DA, et al. Okislitel'naya modifikatsiya belkov: problemyi perspektiv yissledovaniya. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2010;1: 74-8. (In Russ).
 3. Yan LJ. Analysis of oxidative modification of proteins. *Current Protocols in Protein Science.* 2009;56(1):14.4.1-14.4.28.
 4. Pupyshv AV. Permeabilizatsiya lizosomal'nykh membrane kak apoptogennyi faktor. *Citologiya.* 2011;53(4):313-24. (In Russ).
 5. Il'ichyova AS, Fomina MA. Vliyanie L-arginina I karnitina na aktivnost' katepsinov L, H i pronitsaemost' lizosomal'noy membrany v serdchnoy myshtse pri vyrazhennoy gipergomotsisteinemii. *Kazanskij medicinskij zhurnal.* 2015;96(5):819-24. (In Russ). doi:10.17750/KMJ2015-819
 6. Medvedev DV, Zvyagina VI, Fomina MA. Sposob modelirovaniya tyazheloy formy gipergomotsisteinemii u krys. *IP Pavlov Medical Biological Herald.* 2014;22(4):42-6. (In Russ).
 7. Pokrovskiy MV, Pokrovskaya TG, Kochkarov VI. Endotelioprotekturnye efekty L-arginina pri modelirovanii defitsita okisi azota. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2008;71(2):29-31. (In Russ).
 8. Dubinina EE. *Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie). Fiziologicheskie i kliniko-biokhimicheskie aspekty.* SPb.: Izdatel'stvo «Meditsinskaya pressa»; 2006. (In Russ).
 9. Fomina MA, Abalenikhina YuV, Fomina NV, et al. Sposob kompleksnoy otsenki sodержaniya produktov okislitel'noy modifikatsii belkov v tkanyakh I biologicheskikh zhidkostyakh. Patent RUS №2524667, 27.07.2014. Byul. №21 Available at: http://www1.fips.ru/Archive/PAT/2014FULL/2014.07.27/INDEX_RU.HTM. Accessed: 23 Jan 2018. (In Russ).
 10. Nikitina YuV, Mukhina IV. Izmeneniya okislitel'nykh protsessov v tkani golovnoy mozga I krovi krys v rannem ontogeneze. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta imeni N.I. Lobachevskogo.* 2009;6(1):124-31. (In Russ).
 11. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L. *Methods in Enzymol.* 1981;80:535-61.
 12. Boriskina MA. *Izmenenie aktivnosti lizosomal'nykh tsisteinovykh proteinaz u bol'nykh khronicheskimi leykozami v dinamike zabo-levaniya [dissertation].* Ryazan'; 1996. (In Russ).
 13. Gubskiy YuI, Belenichev IF, Levitskiy EL, et al. Toksikologicheskie posledstviya okislitel'noy modifikatsii belkov pri razlichnykh patologicheskikh sostoyaniyakh. *Sovremennye problem toksikologii.* 2005;8(3):20-7. (In Russ).
 14. Il'icheva AS, Fomina MA, Medvedev DV. Kharakteristika produktov okislitel'nogo povrezhdeniya belkov miokarda na fone gipergomotsisteinemii. *Science of Young (Eruditio Juvenium).* 2014;2(4):37-43. (In Russ).
 15. Niu Y, DesMarais TL, Tong Z, et al. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radic Biol Med.* 2015;82:22-8. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.028
 16. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease.

- Clin Chem.* 2006;32:601-23. doi:10.1373/clinchem.2005.061408
17. Vasil'eva OS, Serebrov VYu, Turk B, et al. Izuchenie mekhanizma autokataliticheskoy aktivatsii prokatepsina H in vitro. *Elektronnyy zhurnal «Issledovano v Rossii»*. 2002: 1092-102. Available at: <http://docplayr.ru/31006556-Izuchenie-meha-nizma-autokataliticheskoy-aktivatsii-proka-tepsina-h-in-vitro.html>. Accessed: 23 Jan 2018.
18. Menard R, Carmona E, Takebe S, et al. Auto-catalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro. *J Biol Chem.* 1998;273(8):4478-84.
19. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, et al. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem.* 2001;276:944-51.
20. Terman A, Kurz T, Gustafsson B, et al. Lysosomal Labilization. *IUBMB Life.* 2006; 58(9): 531-9. doi:10.1080/15216540600904885

Дополнительная информация [Additional Info]

Источник финансирования. Бюджет ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России. [**Financial support.** Budget of Ryazan State Medical University.]

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи. [**Conflict of interests.** The authors declare no actual and potential conflict of interests which should be stated in connection with publication of the article.]

Участие авторов: Фомина М.А. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста. Терентьев А.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование. [**Participation of authors.** M.A. Fomina – concept and design of the study, acquisition and processing of the material, statistical processing, writing the text, A.A. Terent'ev – concept and design of the study, editing.]

Информация об авторах [Authors Info]

***Фомина Мария Алексеевна** – к.м.н., доцент, доцент кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, Россия. [**Maria A. Fomina** – MD, PhD, Associate Professor, Associate Professor of Biological Chemistry with a Course of Clinical Laboratory Diagnostics of the Faculty of Additional Professional Education, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia.]

SPIN 1480-4281,

ORCID ID 0000-0001-5550-0625,

Researcher ID S-3374-2016.

E-mail: marya.fom@yandex.ru

Терентьев Александр Александрович – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия. [**Alexander A. Terent'ev** – MD, Grand PhD, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Professor of Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Medical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia.]

SPIN 1141-6524,

ORCID ID 0000-0003-2453-8377,

Researcher ID V-6192-2017.

Цитировать: Фомина М.А., Терентьев А.А. Влияние аргинина на активность и компарментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов при оксидативном стрессе на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2018. Т. 26, №2. С. 195-212. doi: 10.23888/PAVLOVJ2018262195-212.

To cite this article: Fomina MA, Terent'ev AA. The effect of arginine on the activity and compartmentalization of lysosomal cysteine proteases of parenchymatous organs in oxidative stress on the background of experimental hyperhomocysteinemia. *I.P. Pavlov Medical Biological Herald*. 2018;26(2):195-212. doi: 10.23888/PAVLOVJ2018-262195-212.

Поступила/Received: 30.01.2018

Принята в печать/Accepted: 31.05.2018